

Diferencias en la actividad de la enzima ureasa entre *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*

Josep M. Torres-Rodríguez¹, Eidi Alvarado-Ramírez¹ y Ricardo Gutiérrez-Gallego²

¹Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Micología. Institut Municipal d' Investigació Mèdica, Unitat Docente del Institut Municipal de Assistència Sanitària, Universitat Autònoma de Barcelona;

²Departamento de Investigación de Ciencias de la Salud, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, España

Resumen Se considera que la capacidad de *Cryptococcus neoformans* para sintetizar ureasa es uno de sus principales factores de virulencia. Desde 2002 se acepta que la variedad *gattii* de *C. neoformans* reúne los atributos necesarios para considerarse como una nueva especie, *Cryptococcus gattii*. No existen estudios experimentales controlados que comparen el grado de actividad ureasa de ambas especies. El objetivo de este trabajo ha sido analizar la producción de esta enzima en aislamientos de *C. neoformans* y *C. gattii*, considerando la distribución en serotipos de los aislamientos y su origen (clínico o ambiental), utilizando un nuevo método semicuantitativo estandarizado. Veinticinco aislamientos de *C. neoformans* y 19 de *C. gattii* fueron sembrados en medio líquido de urea de Christensen para determinar la producción de ureasa por espectrofotometría. Como referencia se determinó la actividad de una unidad de ureasa (*jack beans urease*[®], Sigma) sobre el mismo medio de cultivo y se observó que el 50% de la actividad enzimática correspondía a una densidad óptica de $A_{550} = 0,215$. Esta absorbancia permitió clasificar la actividad ureasa para cada aislamiento de *Cryptococcus*. Los resultados mostraron que bajo las mismas condiciones, estas levaduras podían agruparse en dos categorías, bajas productoras de ureasa ($A_{550} < 0,215$) y altas productoras ($A_{550} \geq 0,215$). A las 72 horas de incubación, el 76% de los aislamientos de *C. neoformans* y el 15,8% de los de *C. gattii* resultaron altos productores de ureasa. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre ambas especies ($p = 0,016$). Los resultados obtenidos muestran que *C. neoformans* es mayor productor de ureasa que *C. gattii*.

Palabras clave *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, Factores de patogenicidad, Ureasa

Urease activity in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*

Summary Urease is an enzyme considered one of the main virulence factors in *Cryptococcus neoformans*. Quantitative differences in urease production between *C. neoformans* and the new species *Cryptococcus gattii* have not been so far documented. Using a standardized method, 25 isolates of *C. neoformans* and 19 of *C. gattii* were seeded in Christensen urea broth medium for urease activity detection. Approximately, the 50% of activity of one unit of commercial *jack beans urease* ($A_{550} = 0.215$) was considered as a reference to classified the *Cryptococcus* in two categories, low ($A_{550} < 0.215$) or high ($A_{550} \geq 0.215$) urease producers. After 72 hours of incubation, 76% of *C. neoformans* and 15.8% of *C. gattii* strains were high urease producers ($p = 0.016$). Based on these results, the species *C. neoformans* appeared as the highest urease producer. Other virulence factors should also be investigated to explain *C. gattii* pathogenicity.

Key words *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, Pathogenic factors, Urease

Dirección para correspondencia:
Dr. Josep M. Torres-Rodríguez
IMIM
C/Dr. Aiguader 88
08003 Barcelona, España
Tel.: +34 933160400
Fax: +34 933160410
E-mail: jmtorres@imim.es

Aceptado para publicación el 19 de octubre de 2007

©2008 Revista Iberoamericana de Micología
Apdo. 699, E-48080 Bilbao (Spain)
1130-1406/01/10.00 €

La ureasa es una metaloenzima que cataliza la conversión de urea a amonio y carbamato. La detección de esta enzima se utiliza corrientemente como una prueba para la identificación de diversos microorganismos, entre ellos *Cryptococcus* [1,19].

La ureasa es considerada junto con otras enzimas (proteinasas, fosfolipasas y lacasas) como un importante factor de virulencia [9,12,27]. Excepcionalmente se han aislado cepas de *Cryptococcus neoformans* sin actividad ureasa de pacientes con criptococosis [4].

Las dos antiguas variedades de *C. neoformans* se han reclasificado en dos especies diferentes: *C. neoformans* (serotipos A y D) y *Cryptococcus gattii* (serotipos B y C) [17]. Prácticamente todos los estudios realizados en relación a la actividad ureasa se han efectuado en *C. neoformans* o no se ha especificado la variedad utilizada.

La mayoría de los pacientes de criptococosis están infectados por *C. neoformans* variedad *grubii* (serotipo A), que se aísla con mayor frecuencia de muestras ambientales relacionadas, principalmente, con excrementos de palo-

mas [13,15,20]. *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipo D) también se ha aislado de muestras clínicas y ambientales en determinadas áreas geográficas [3].

La nueva especie *C. gattii* presenta una distribución geográfica más restringida, obteniéndose del medio ambiente, estando relacionada con material vegetal, si bien es también agente etiológico de criptococosis humana y animal, produciendo en ocasiones verdaderas epidemias [2,14]. A pesar de que la mayor presencia de esta especie se ha descrito en Australia, Nueva Zelanda y el continente americano [23] también se ha encontrado en Europa incluyendo España [10,13], donde fue la causa de brotes epidémicos en cabras inmunocompetentes en la provincia de Cáceres [26].

La patología producida por *C. gattii* puede ser similar a la ocasionada por hongos patógenos primarios, afectando a sujetos no inmunodeprimidos [24]. Por dicho motivo es importante estudiar específicamente los factores de patogenicidad de *C. gattii*, comparándolos con los que han sido descritos para *C. neoformans* [5]

Tabla. Distribución de las cepas evaluadas: especies, serotipos, origen humano, animal o ambiental. Lectura espectrofotométrica (550 nm) de 25 aislamientos de *C. neoformans* y 19 de *C. gattii* cultivados en medio líquido de urea de Christensen a las 72 h de incubación.

Cepa	Especie	Serotipo	Origen	País (550 nm)	Absorbancia
169 A	<i>C. neoformans</i>	A	ambiental	Brasil	0,121
178C	<i>C. neoformans</i>	A	clínica humana	España	0,146
33C	<i>C. neoformans</i>	A	clínica humana	España	0,149
25C	<i>C. neoformans</i>	A	clínica humana	España	0,235
95A	<i>C. neoformans</i>	A	ambiental	España	0,275
84C	<i>C. neoformans</i>	A	clínica humana	España	0,282
2A	<i>C. neoformans</i>	A	ambiental	España	0,320
74C	<i>C. neoformans</i>	A	clínica humana	España	0,301
1A	<i>C. neoformans</i>	A	ambiental	España	0,324
146A	<i>C. neoformans</i>	A	clínica humana	España	0,331
41C	<i>C. neoformans</i>	A	clínica humana	España	0,338
76A	<i>C. neoformans</i>	A	ambiental	España	0,414
186C	<i>C. neoformans</i>	A	clínica humana	España	0,432
158C	<i>C. neoformans</i>	A	clínica humana	España	0,475
43C	<i>C. neoformans</i>	A	clínica humana	España	0,501
6C	<i>C. neoformans</i>	D	clínica humana	España	0,153
179C	<i>C. neoformans</i>	D	clínica humana	España	0,160
1C	<i>C. neoformans</i>	D	clínica humana	España	0,190
99C	<i>C. neoformans</i>	D	clínica humana	España	0,275
D12C	<i>C. neoformans</i>	D	clínica humana	España	0,288
D297C	<i>C. neoformans</i>	D	clínica humana	España	0,295
94C	<i>C. neoformans</i>	D	clínica humana	España	0,322
145C	<i>C. neoformans</i>	D	clínica humana	España	0,374
181C	<i>C. neoformans</i>	D	clínica humana	España	0,458
97C	<i>C. neoformans</i>	D	clínica humana	España	0,474
GR-56	<i>C. gattii</i>	B	veterinario (cabra)	España	0,132
GR-46	<i>C. gattii</i>	B	veterinario (cabra)	España	0,139
269C	<i>C. gattii</i>	B	clínica humana	México	0,145
104C	<i>C. gattii</i>	B	veterinario (<i>cheeta</i>)	Cuba	0,145
432C	<i>C. gattii</i>	B	clínica humana	México	0,149
75A	<i>C. gattii</i>	B	ambiental	Brasil	0,150
417C	<i>C. gattii</i>	C	clínica humana	Venezuela	0,163
GR-52	<i>C. gattii</i>	B	veterinario (cabra)	España	0,175
GR-53	<i>C. gattii</i>	B	veterinario (cabra)	España	0,175
160A	<i>C. gattii</i>	C	ambiental	Colombia	0,176
24C	<i>C. gattii</i>	C	ambiental	Brasil	0,177
267C	<i>C. gattii</i>	B	clínica humana	México	0,178
74A	<i>C. gattii</i>	B	ambiental	Brasil	0,183
GR-50	<i>C. gattii</i>	B	veterinario (cabra)	España	0,184
GR-48	<i>C. gattii</i>	B	veterinario (cabra)	España	0,191
GR-59	<i>C. gattii</i>	B	veterinario (cabra)	España	0,208
162A	<i>C. gattii</i>	B	ambiental	Perú	0,259
268C	<i>C. gattii</i>	B	clínica humana	México	0,315
161A	<i>C. gattii</i>	B	ambiental	Australia	0,331

En 1987, Kwon-Chung et al. [16], estudiando solo tres cepas de las dos variedades de *C. neoformans*, describieron que el EDTA, debido a su efecto quelante, suprimía la actividad ureasa de la variedad *gattii*, pero no de la variedad *neoformans*. Hasta la fecha no existen publicaciones que, utilizando un método estandarizado, describan las posibles diferencias cuantitativas en la actividad ureasa entre *C. neoformans* and *C. gattii*.

El objetivo de este trabajo fue clasificar los niveles de actividad ureasa de un número importante de aislamientos de todos los serotipos de *C. neoformans* y *C. gattii*. Para ello se ha diseñado un método estandarizado que permite analizar objetivamente las diferencias en la actividad enzimática en las cepas estudiadas.

La información obtenida contribuye a conocer las diferencias en este factor de patogenicidad existente en las dos especies de *Cryptococcus*.

Materiales y métodos

Aislamientos. Se han incluido 44 cepas de ambas especies, siendo 25 de *C. neoformans*, de las cuales 15 pertenecen al serotipo A (variedad *grubii*), y 10 al serotipo D (variedad *neoformans*). De las 19 cepas correspondientes a *C. gattii*, 16 son del serotipo B y tres del serotipo C.

Cinco aislamientos del serotipo A, cuatro del B y dos del C se obtuvieron de muestras ambientales. Las demás cepas de *C. neoformans* se aislaron del líquido cefalorraquídeo de pacientes infectados con el VIH que habían desarrollado una meningitis criptocócica. Ocho cepas de *C. gattii* fueron aisladas de animales inicialmente sanos y cinco de pacientes con criptococosis del sistema nervioso central (Tabla).

Todos los aislamientos se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en leche descremada en la colección del URMIM (*Unitat de Recerca en Malalties Infeccioses i Micologia/Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Micología*). En el momento de utilizarse se sembraron en agar glucosado de Sabouraud para confirmar que las levaduras eran viables y el cultivo puro, verificándose el serotipo por medio de la prueba de aglutinación de látex (*Crypto-Check kit*, Iatron Labs Inc, Japón).

Medio de cultivo. Se utilizó el medio líquido de urea de Christensen (Difco, Detroit, EE.UU.) [1]. Este caldo contiene urea (20 g/l, 300 nM) y rojo-fenol como indicador de pH. La conversión de urea a amonio incrementa el pH y se produce un cambio de color de amarillo a rosa brillante; en este caso la reacción se considera positiva. Las variaciones en la intensidad de la reacción pueden ser detectadas por espectrofotometría.

Determinación de la actividad enzimática. Para elaborar la recta de la actividad enzimática, se empleó una unidad de ureasa comercial (*Jack beans urease*®, Sigma Aldrich, España), que fue diluida en tampón fosfato potásico ($\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$) 10 mM, pH 8.

Diez microlitros de la solución de la enzima fueron agregados a tubos de vidrio que contenían 3 ml de caldo de urea de Christensen. La mezcla se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ midiéndose la absorbancia a 550 nm a partir de cada minuto durante un periodo de 20 min, momento a partir del cual no se apreciaron más variaciones. La recta de regresión se elaboró utilizando los valores numéricos de absorbancia de las diferentes lecturas (Figura 1). Esta recta se consideró como el patrón de referencia para tomar un punto de corte que permitiera categorizar el grado de actividad ureasa correspondiente a cada aislamiento de *Cryptococcus* sembrado en el mismo medio.

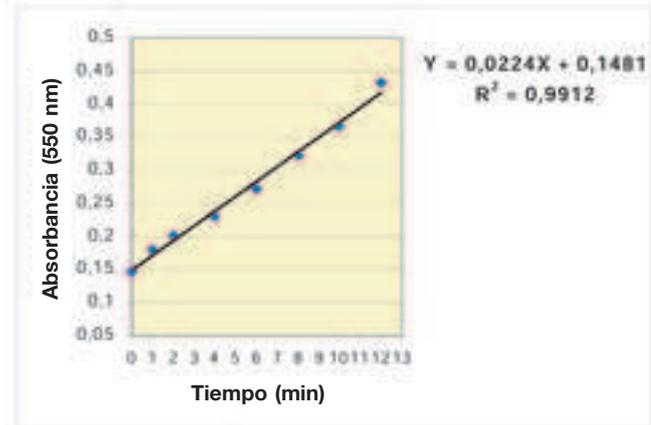


Figura 1. Recta de referencia realizada a partir de una unidad de ureasa comercial (*jack bean's urease*®, Sigma) actuando entre 0 y 15 min sobre el medio líquido de urea de Christensen. Máxima absorbancia obtenida ($A = 0,432$) a los 12 min. Punto de corte correspondiente al 50% de actividad enzimática $A = 0,215$.

Cultivo e incubación de los aislamientos. Cada uno de los 44 aislamientos de *C. neoformans* y *C. gattii* fue suspendido en una solución salina tamponada con fosfato, pH 7, ajustando la concentración a 10^5 CFU/ml por recuento en cámara de Neubauer. Un volumen de 0,1 ml de cada suspensión fue inoculado en 12 tubos que contenían cada uno 3 ml de medio líquido de urea de Christensen. Todos los tubos fueron incubados a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 144 horas. A partir de la primera hora de incubación y en las 2, 4, 24, 72, 96, 120 y 144 horas, se utilizó uno de los tubos para leer la absorbancia de su contenido. La actividad enzimática se midió utilizando un espectrofotómetro (Hewlett Packard 8452A) a 550 nm.

Estos procedimientos se realizaron por duplicado en un 25% de los aislamientos, tomados al azar.

Control de crecimiento. Una muestra de cada inóculo se cultivó a las 0, 24, 48, 72 y 96 h en placas de agar glucosado de Sabouraud, incubando a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 h. Se contaron el número de UFC/ml desarrolladas con cada cepa en los periodos indicados.

Análisis estadístico. Los resultados se presentan en valores absolutos y en porcentajes. La prueba de Pearson χ^2 fue aplicada para estudios comparativos y la *t* de Student se aplicó para analizar la distribución de las variables. La significación estadística se situó en $p \leq 0,05$.

Se utilizó el programa estadístico SPSS-Windows 14.0 (SPSS Inc. EE.UU.) para realizar todas las pruebas.

Resultados

La unidad de ureasa comercial actuó rápidamente sobre el medio líquido de Christensen, comprobándose que la cinética enzimática produce el máximo de cambio calorimétrico en 12 min, tiempo en que se ha producido la transformación de urea a amonio. En este momento, la absorbancia a 550 nm alcanzó un valor de 0,450, que persistió sin cambios hasta los 20 min. La figura 1 muestra la actividad enzimática en función del tiempo de una unidad de urea en valores de absorbancia a 550 nm. El mismo método se aplicó en tres ocasiones en diferentes días, obteniéndose resultados similares.

Para poder clasificar la actividad ureasa durante el periodo de incubación de las cepas de *Cryptococcus* se consideró un valor arbitrario del 50% de la absorbancia máxima que correspondía a 0,215. Este valor es el que se alcanza con una unidad enzimática de ureasa a los tres minutos de incubación (Figura 1).

Conforme a este punto de corte, las cepas que produjeron $A_{550} < 0,215$ fueron categorizadas como bajas productoras de ureasa, mientras que por encima de $A_{550} \geq 0,215$ se clasificaron como altas productoras de esta enzima.

A las 72 h de incubación la mayoría de los aislamientos de *Cryptococcus* habían incrementado los valores iniciales de absorbancia, incremento que fue progresivo hasta las 144 h en que se estabilizó. La distribución de los valores de absorbancia de las cepas por especies, serotipos y origen clínico (humano, veterinario o ambiental) se muestran en la tabla 1.

Los primeros cambios con significación estadística se observaron a las 72 h, por lo que se tomó este tiempo de incubación para efectuar el análisis comparativo de los distintos valores de absorbancia obtenidos.

Al cabo de 144 h de incubación se comprobó un considerable aumento en el pH del medio, resultando superior a ocho en el 64% de los tubos. Al efectuar el cultivo de todos los aislamientos se comprobó que el 25% de las cepas no eran viables.

Las variaciones observadas en la absorbancia de las 44 cepas de *Cryptococcus* a las 72 h de incubación, teniendo en cuenta el punto de corte $A_{550} < 0,215$, se muestran en la figura 2. Cuatro de los aislamientos de *C. neoformans* alcanzaron el valor máximo de absorbancia: 0,450-0,500.

En 11 cepas tomadas aleatoriamente, correspondientes al 25%, del total se repitieron las determinaciones en dos ocasiones, obteniéndose resultados semejantes, con una variación máxima de 0,07.

El 76% de los aislamientos de *C. neoformans* (n = 19) y el 15,8% de los de *C. gattii* (n = 3) fueron clasificados como altos productores de ureasa, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (p = 0,016). Por el contrario, no hubo diferencias significativas según el origen clínico o ambiental de las cepas ni entre los serotipos A y D.

Discusión

La ureasa es una metaloenzima considerada como un importante factor de patogenicidad en muchos microorganismos, como *Proteus mirabilis* y *Helicobacter*, entre otros [18,19].

La capacidad de sintetizar ureasa por *Cryptococcus* ha sido utilizada como una prueba bioquímica de identificación desde hace más de medio siglo [22] y también es considerada como uno de los principales factores de virulencia en *C. neoformans* [11]. Olszewski et al. han sugerido en un modelo experimental de criptococosis del ratón, que la ureasa producida durante la diseminación hematológica por la cepa *C. neoformans* H99, contribuye a la invasión del sistema nervioso central al incrementar la presencia de levaduras del lecho de los capilares del cerebro [21].

La actividad ureasa en aislamientos de *Cryptococcus* se puede demostrar por diversas pruebas de laboratorio, incluyendo métodos rápidos [7]; no obstante la prueba de la ureasa en medio de Christensen es la más ampliamente utilizada [28].

Solamente se dispone de información muy limitada referida a la actividad ureasa por las diferentes especies de *Cryptococcus*. Booth y Vishniac describieron en 1987 que *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* (*C. neoformans*) presentaba una resistencia diez veces superior a la de *F. neoformans* var. *bacillispora* (*C. gattii*) al EDTA (ácido etilendiamina-tetraacético), agente quelante que inhibe la producción de ureasa [6]. Kwon-Chung et al., analizaron extractos celulares de la cepa NIH 191 de *C. neoformans* var. *gattii*, observando que 100 μM de

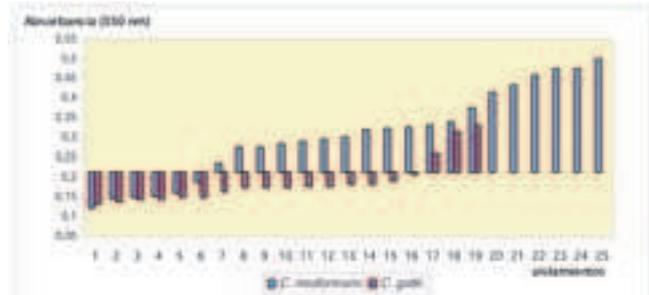


Figura 2. Lectura espectrofotométrica a 550 nm de la actividad ureasa de *Cryptococcus neoformans* (n = 25) y *Cryptococcus gattii* (n = 19) después de 72 h de incubación en medio líquido de urea de Christensen. Punto de corte A = 0,215: 76% de los aislamientos de *C. neoformans* y el 15,8% de los de *C. gattii* (n = 3) fueron clasificados como altos productores de ureasa.

EDTA producía una reducción del 86% en la actividad ureasa, y que ésta era solamente del 30% en la cepa B-3501 de *C. neoformans* var. *neoformans* [16]. Estos investigadores sugirieron que se podría utilizar una prueba de inhibición de la ureasa como otro criterio más para distinguir las dos variedades –actualmente especies– de *Cryptococcus*.

Los resultados obtenidos con el control de crecimiento, no mostraron diferencias en la velocidad de desarrollo de las diferentes cepas que pudieran indicar que la mayor producción de ureasa fuera dependiente de una mayor biomasa.

Los datos de este estudio han permitido clasificar en dos categorías el grado de actividad en un considerable número de aislamientos diversos de ambas especies. Estadísticamente se ha demostrado que *C. neoformans* posee mayor actividad ureasa que *C. gattii*, sin que se hallaran diferencias significativas entre los serotipos A y D.

Varias de las cepas de *C. gattii* del serotipo B estudiadas habían demostrado ser altamente patógenas en un modelo experimental de criptococosis en ratones inmunocompetentes [25]. Estas mismas cepas presentaron un bajo nivel de actividad ureasa, por lo que cabe suponer que la actividad de otras enzimas como la lacasa [12] y la fosfolipasa [27], así como diversos factores patógenos juegan un rol fundamental en la virulencia de esta especie [5,8].

Aunque indudablemente la ureasa tiene un rol importante en la patogenicidad de ambas especies de *Cryptococcus*, es muy probable que sea el efecto de varios factores combinados lo que determina la virulencia de esta levadura.

Este estudio recibió el soporte PI02/0413 del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), del Ministerio de Sanidad de España.

Agradecemos a Joan Vila y Josep M. Manresa el asesoramiento estadístico y a Yolanda Morera su ayuda técnica.

Bibliografía

1. Atlas RM, Parks LC. Handbook of Microbiological Media. Boca Raton, CRC Press, 1993.
2. Baró T, Torres-Rodríguez JM, De Mendoza MH, Morera Y, Alía C. First identification of autochthonous *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* isolated from goats with predominantly severe pulmonary disease in Spain. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 458-461.
3. Baró T, Torres-Rodríguez JM, Morera Y, Alía C, Lopez O, Mendez R. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Spain. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1170-1172.
4. Bava AJ, Negroni R, Bianchi M. Cryptococcosis produced by urease negative strain of *Cryptococcus neoformans*. *J Med Vet Mycol* 1993; 31: 87-89.
5. Blackstock R, Buchanan KL, Cherniak R, Mitchell TG, Wong B, Bartiss A, Jackson L, Murphy JW. Pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* is associated with quantitative differences in multiple virulence factors. *Mycopathologia* 1999; 147: 1-11.
6. Booth JL, Vishniac HS. Urease testing and yeast taxonomy. *Can J Microbiol* 1987; 33: 396-404.
7. Canteros CE, Rodero L, Rivas MC, Davel G. A rapid urease test for presumptive identification of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 1996; 136: 21-23.
8. Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. Washington DC, ASM Press 1998.
9. Chen LC, Blank ES, Casadevall A. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996; 5: 570-574.
10. Colom MF, Frases S, Ferrer C, Jover A, Andreu M, Reus S, Sánchez M, Torres-Rodríguez JM. First local case of human cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Spain. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3548-3550.
11. Cox GM, Mukherjee J, Cole GT, Casadevall A, Perfect JR. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect Immun* 2000; 68: 443-448.
12. Doering TL, Nosanchuk JD, Roberts WK, Casadevall A. Melanin as a potential cryptococcal defence against microbicidal proteins. *Med Mycol* 1999; 37: 175-181.
13. Dromer F, Mathoulin S, Dupont B, Laporte A. Epidemiology of cryptococcosis in France: a 9-year survey (1985-1993). French Cryptococcosis Study Group. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 82-90.
14. Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, Macdougall L, Boekhout T, Kwon-Chung KJ, Meyer W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 17258-17263.
15. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Epidemiol* 1984; 120:123-130.
16. Kwon-Chung KJ, Wickes BL, Booth JL, Vishniac HS, Bennett JE. Urease inhibition by EDTA in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1987; 55: 1751-1754.
17. Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Fell JW, Diaz M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. honduricus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenozymetes, Tremellomycetidae). *Taxon* 2002; 51: 804-806.
18. Mathur S, Suller MT, Stickler DJ, Feneley RC. Factors affecting crystal precipitation from urine in individuals with long-term urinary catheters colonized with urease-positive bacterial species. *Urol Res* 2006; 34: 173-177.
19. Mc Gee DJ, Coker C, Testerman TL, Harro JM, Gibson SV, Mobley HL. The *Helicobacter pylori* flbA flagellar biosynthesis and regulatory gene is required for motility and virulence and modulates urease of *H. pylori* and *Proteus mirabilis*. *J Med Microbiol* 2002; 51: 958-970.
20. Morera-López Y, Torres-Rodríguez JM, Jiménez-Cabello T, Baró-Tomás T, Alía-Aponte C, Lázera MS. DNA fingerprinting pattern and susceptibility to antifungal drugs in *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* isolates from Barcelona city and rural environmental samples. *Mycopathologia* 2005; 160: 9-14.
21. Olszewski MA, Noverr MC, Chen GH, Toews GB, Cox GM, Perfect JR, Huffnagle GB. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *Am J Pathol* 2004; 164: 1761-1771.
22. Seeliger HP. Use of a urease test for the screening and identification of cryptococci. *J Bacteriol* 1956; 72: 127-131.
23. Sorrell T. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med Mycol* 2001; 39: 155-168.
24. Speed B, Dunt D. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Infect Disc* 1995; 21: 28-36.
25. Torres-Rodríguez JM, Morera Y, Baró T, Corominas JM, Castañeda E. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in an immunocompetent mouse model. *Med Mycol* 2002; 41: 59-63.
26. Torres-Rodríguez JM, Hermoso de Mendoza M, Alvarado-Ramírez E, Segura-Roca G. Cryptococcosis by *Cryptococcus gattii* in immunocompetent goats in Spain and review of the literature. *Acta Sci Vet* 2006; 34: 245-253.
27. Vidotto V, Leone R, Sinicco A, Ito-kuwa S, Criseo G. Comparison of phospholipase production in *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients and bird droppings. *Mycopathologia* 1998; 142: 71-76.
28. Warren NG, Hazen KC. *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeasts of medical importance. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (Eds.) Manual of Clinical Microbiology. Sexta edición. Washington, ASM, 1995: 723-737.